

## グリコケノデオキシコール酸による培養マウス胆管上皮での アポトーシス誘導およびアポトーシス関連蛋白の発現

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林 健一教授)

金沢大学医学部医学科病理学第二講座 (主任: 中沼 安二教授)

岩 田 充 弘

原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) では、アポトーシスによる細胞死が胆管上皮の消失の基本病変であると考えられているが、その正確なプロセスは不明である。最近、胆汁の重要な構成成分である胆汁酸が、胆管上皮そのものに対しアポトーシス誘導作用あるいは抗アポトーシス作用を示すことが報告されている。本研究では、PBCの胆管破壊解明のための基礎的研究として、野生型マウス (BALB/c) および機能的 Fas 受容体 (Fas receptor, FasR) 欠損マウス (C3H・MRL-Fas<sup>lpr</sup>) 由来培養肝内胆管上皮細胞株を用い、抱合型疎水性胆汁酸の一つであるグリコケノデオキシコール酸 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA) のアポトーシス誘導およびそのプロセスについて検討した。その結果、GCDCAはBALB/c由来胆管上皮細胞株 (MBEC-W) において、用量および時間依存性にアポトーシスを誘導した。直接アポトーシスを誘導することが知られているビューベリシン (beauvericin) 処理群ではアポトーシスは4時間後にみられるのに比し、GCDCA負荷後のアポトーシスは、24時間後から観察され遅く出現した。このことは、GCDCAによるアポトーシス誘導は、GCDCAの直接作用ではなく他の因子の介在により間接的に実行されるものと考えられた。免疫組織化学的、分子生物学的検討によりGCDCA負荷MBEC-Wでは、FasR、Fasリガンド (Fas ligand, FasL)、アネキシンV、加工型カスパーゼ-3およびアピカル側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) の発現が亢進していることが示された。さらにGCDCAの負荷により、インターロイキン-18 (interleukin-18, IL-18) mRNAの発現亢進がFasL mRNAの発現に先行して認められ、さらに培養液に活性型IL-18の分泌が認められた。またIL-18のレセプターであるIL-18受容体 $\alpha$  (IL-18 receptor  $\alpha$ ) mRNAの恒常的な発現が確認された。一方、機能的FasR欠損マウスであるC3H・MRL-Fas<sup>lpr</sup>由来胆管上皮細胞株 (MBEC-lpr) ではアポトーシスの誘導は認められなかった。以上の結果から、GCDCAはASBTを介しマウス胆管上皮細胞内に取り込まれ、その結果FasR発現の亢進およびIL-18産生に伴うFasL発現亢進をきたし、胆管上皮細胞相互のオートクリン、パラクリンの機序でFasR/FasL系シグナルにより胆管上皮のアポトーシスを誘導していることが示された。また、この系のアポトーシスはカスパーゼ-3の活性化により実行され、その過程でアネキシンVの細胞質から細胞膜への移動が生じていることも示された。生体内においても、GCDCAを含めた胆汁酸による胆管上皮のアポトーシスが、ヒトの肝内胆管病変の発生、進展に何らかの役割を果たしているものと推定された。

**Key words** Fas receptor/Fas ligand-system, caspase-3, annexin V, apical sodium-dependent bile acid transporter, interleukin-18

肝内胆管は一層の胆管上皮細胞で覆われている。原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC)、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) および肝移植後の拒絶反応などの免疫介在性肝胆道系疾患では、胆管上皮自身が標的細胞となっており、その脱落が肝内胆管病変、特に胆管消失 (vanishing bile duct syndrome) の重要な病的機序となっている<sup>1)~9)</sup>。さて、アポトーシスは能動的でプログラム化された細胞死であり、正常組織のホメオスタシスの維持や様々な病態形成に関与している。従来の研究により、Fas受容体 (Fas receptor, FasR)/Fasリガンド (Fas ligand, FasL) を介したア

ポトーシスは、免疫介在性胆管消失の重要な機序として認識されており、FasL陽性Tリンパ球がFasRを表达した胆管上皮細胞を攻撃し、その結果胆管上皮細胞が破壊、消失するとされる<sup>7)~9)</sup>。近年、リンパ球以外の様々な細胞にもFasLの発現が知られており、自己免疫性疾患での標的細胞の破壊機構あるいは悪性腫瘍の免疫回避機構に何らかの役割を演じているとされている<sup>10)~17)</sup>。しかし、胆管上皮細胞でのFasLの表达や病的プロセスにおける役割に関する研究はなされていない。

さて、胆汁中の重要な成分である胆汁酸は、親水性胆汁酸および疎水性胆汁酸に大別される。胆汁酸の種類や標的臓器によ

平成11年11月25日受付、平成12年1月12日受理

Abbreviations: ASBT, apical sodium-dependent bile acid transporter; BV, beauvericin; DAB, diaminobenzidine; FasL, Fas ligand; FasR, Fas receptor; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; GVHD, graft-versus-host disease; IL, interleukin; IL-18R $\alpha$ , interleukin-18 receptor  $\alpha$ ; PBC, primary biliary cirrhosis; PCNA, proliferating cell nuclear

って、これら胆汁酸は種々の生理的、病的効果を有する。すなわち、腸管上皮においては、胆汁酸はDNA合成促進作用や発癌作用を有し<sup>18)19)</sup>、親水性胆汁酸であるウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) は肝細胞保護作用を示す<sup>20)~22)</sup>。一方、疎水性胆汁酸 (とくに非抱合型) は肝細胞に対しアポトーシス誘導作用を有する<sup>23)24)</sup>。胆汁酸の胆管上皮に対する作用についても2, 3の研究がなされており、Alpiniら<sup>25)26)</sup>は抱合型疎水性胆汁酸は胆管上皮の増殖およびセクレチンの分泌を促進したと報告している。またBenedettiら<sup>27)</sup>は、親水性あるいは抱合型疎水性胆汁酸は胆管障害 (ネクローシス) を誘導しないが、非抱合型疎水性胆汁酸は胆管障害性を示したと報告している。しかし、胆汁酸による胆管細胞のアポトーシス誘導に関連した検討は殆どなされていない。

今回、PBCに代表される免疫介在性肝内胆管系疾患における肝内胆管の破壊機序の一端を実験的に明らかにするため、胆汁酸による胆管上皮細胞のアポトーシス誘導とその機序をFasR/FasL系を中心に検討した。つまり、培養マウス胆管細胞株に抱合型疎水性胆汁酸の一つであるグリコケノデオキシコール酸 (glycochenodeoxycholic acid, GCDCA) を負荷し、胆管細胞におけるアポトーシス、細胞増殖、アポトーシス関連分子 (FasR, FasL, カスパーゼ-3およびアネキシンV) の蛋白およびmRNAの発現、アピカル側ナトリウム依存性胆汁酸トランスポーター (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) mRNAの発現、インターロイキン (interleukin, IL) -18 mRNAの発現と培養上清中の活性型IL-18濃度およびIL-18受容体 $\alpha$  (IL-18 receptor  $\alpha$ , IL-18R $\alpha$ ) mRNAの発現の5項目について検討を行った。なお、アネキシンVは近年マウスの末梢胆管に特異的かつ高度に発現していることが示されており<sup>28)</sup>、また細胞膜表面に提示されたフォスファチジルセリンに結合する特性からアポトーシス早期のマーカーとして利用されている。ASBTはヒトおよびラットの胆管上皮に発現し、抱合型胆汁酸の細胞内への取り込みに関与している<sup>29)~32)</sup>。またIL-18はIL-1レセプターファミリーに属するIL-18R $\alpha$ と結合し、おもにインターフェロン $\gamma$ を誘導するサイトカインであるが<sup>33)34)</sup>、FasLの発現誘導作用も有し、Fas系を介したアポトーシスを促進させることが報告されている<sup>35)~38)</sup>。

## 材料および方法

### I. 実験動物および胆管細胞株の樹立

#### 1. マウス肝内胆管細胞の単離

野生型マウス (BALB/c) および機能的FasR欠損マウス (C3H・MRL-Fas<sup>lpr</sup>) の8週齢老齢雌マウスの肝内末梢胆管細胞をKatayanagiら<sup>39)</sup>の方法により単離、培養した。すなわち、IA型コラーゲンナーゼ (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) を下大静脈より還流し、その後肝細胞を可及的に除去したのち肝内胆管樹を作製した。実体顕微鏡下で末梢胆管のみを切離、採取し、10% Nu-serum V (Becton Dickinson, Bedford, USA), 2.5mg/l フォルスコリン (Sigma Chemical Co.), 20ng/ml マウス上皮成長因子 (Life Technologies, Inc., Grand Island, USA), 12.5mg/ml ウシ下垂体抽出物 (Becton Dickinson), 5nM 甲状腺ホルモンT3 (Sigma Chemical Co.), 10ml/l ITS+ (Becton

Dickinson) および10ml/l 100X antibiotic mycotic solution (Life Technologies, Inc.) を添加したDMEM/F-12培地 (Life Technologies, Inc.) 内で、37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で1日間培養した。次に組織片をIA型コラーゲン (新田ゼラチン, 大阪) 上に移植し4週間培養した。移植組織片辺縁より胆管上皮細胞のシート状の増殖があり、形態学的に胆管上皮と思われる部分のみを偏光顕微鏡下で切り取り、新たなコラーゲンゲル上に再移植した。この過程を4回繰り返したのち、I型コラーゲンナーゼおよびデスパーゼ (Life Technologies, Inc.) 混合液にてコラーゲンを消化し、胆管上皮細胞を回収した。胆管上皮細胞と反応することが知られているポリクローナル抗ケラチン抗体 (Z622) (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いた免疫染色にて増殖した細胞のほぼ100%が胆管上皮細胞であることを確認した。

#### 2. マウス肝内胆管細胞の単層培養および3次元培養

上記の過程により樹立した培養胆管細胞株 [MBEC-W (BALB/c由来) およびMBEC-lpr (C3H・MRL-Fas<sup>lpr</sup>由来)] から、 $1 \times 10^5$ 個の胆管細胞をIA型コラーゲンで覆われたウェル上で、37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で2週間培養した。これらの細胞はゲル上で単層でシート状に発育した。

次に、Katayanagiら<sup>39)40)</sup>の方法より胆管上皮細胞の3次元培養を施行した。すなわち $1 \times 10^6$ 個/cm<sup>3</sup>の胆管細胞をIA型コラーゲンに混和、ウェル内に注入し37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で5日間培養した。これらの増殖細胞は3次元的に成長し、細胞極性を有する嚢胞を形成した。

### II. GCDCAおよびビューベリシン (beauvericin, BV) の負荷方法

GCDCA (Sigma Chemical Co.) を100 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 500 $\mu$ M および1000 $\mu$ Mの濃度で、またはBV (Sigma Chemical Co.) を5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ Mおよび50 $\mu$ Mの濃度で培地内に混和し、胆管細胞株 (単層培養および3次元培養) を37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で4時間, 12時間, 24時間, 48時間培養した。BVはK<sup>+</sup>イオノホアの一種で、Ca<sup>2+</sup>依存性にカスパーゼ-3を活性化し、培養ラット胆管細胞のアポトーシスを直接誘導する<sup>41)</sup>ことが知られており、BV負荷による培養細胞のアポトーシスを陽性コントロールとして用いた。なお単層培養細胞株を用いた実験では、アポトーシス細胞の脱落、浮遊を防ぐため、GCDCAおよびBV負荷前に培養胆管細胞層上にゲルを重ねた。

### III. 肝内胆管細胞のアポトーシスおよび増殖活性の検討

#### 1. 材料の作成

肝内胆管細胞を培養した各ウェル内に10%中性緩衝ホルマリンを入れ2日間固定後、培養細胞を含んだコラーゲンゲルを剥離しパラフィン包埋ブロックを作成した。これらから3 $\mu$ m厚の連続切片を作成し以下の検討に使用した。

#### 2. アポトーシスの検出

アポトーシス細胞の同定はterminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL)法により行った。すなわち、脱パラフィン切片を親水化後、20 $\mu$ g/ml プロテナーゼK (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) にて5分間処理した。次にTdTおよびフル

オレセイン標識 dUTP を含有した TdT 緩衝液 (in situ cell detection kit, POD, Boehringer Mannheim) を混和後, 切片上に滴下し 37℃, 60 分反応させた。PBS にて洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体を 37℃, 60 分反応させた。PBS で洗浄後, デアミノベンゼジン (diaminobenzidine, DAB) で褐色に発色させ, メチルグリーンにて核染した。顕微鏡下で 1000 個以上の培養細胞を観察, アポトーシス陽性細胞を数え, アポトーシス指数 (= TUNEL 陽性細胞数/全細胞数) を算出した。

### 3. 増殖活性の評価

増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) は G1 期後期から S 期にかけて核内に集積する DNA ポリメラーゼ  $\delta$  の補助因子であり, 培養細胞の増殖活性の指標として用いられている<sup>42)</sup>。PCNA の免疫染色を用い培養細胞の増殖活性を評価した。一次抗体として, マウスモノクローナル抗 PCNA 抗体 (Novocastra Lab., Newcastle, UK) を用いた。マウス組織切片に応用するため, DAKO 社のポリマーイムノコンプレックス法に従い染色を行った。すなわち, 等量のペルオキシダーゼ標識デキスランポリマー (マウス 1 次抗体用 Envision+, DAKO) と PCNA 抗体 (50 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。その後, Envision+ 抗マウスイムノグロブリン抗体の非結合部をブロックするため正常マウス血清 (DAKO) で室温, 1 時間反応させ, 免疫複合体を作成した。組織切片は, 脱パラフィン後, マイクロウェーブ処理 (10mM クエン酸緩衝液, pH6.0, 800 ワット, 20 分) にて抗原賦活化を行い, さらに免疫複合体の核内への浸透を高めるため, デキストラナーゼ (Sigma Chemical Co.) で 5 分間処理した。次に, 作製した免疫複合体を切片上に滴下し室温で 60 分反応させた。PBS で数回洗浄後 DAB で褐色に発色させメチルグリーンにて核染した。増殖活性の評価は 1000 個以上の培養細胞を観察し, 増殖指数 (= PCNA 陽性細胞数/全細胞数) の算出により行った。

## IV. 肝内胆管細胞株におけるアポトーシス関連分子の発現

### 1. 免疫組織化学的検討

FasR, FasL, カスパーゼ-3 の免疫染色を Envision システム (DAKO) で, アネキシン V の免疫染色をアビジン-ビオチン複合体 (avidin-biotin complex, ABC) 法<sup>43)</sup>で行った。FasR およびカスパーゼ-3 の免疫染色は, 切片をマイクロウェーブ処理後に行った。1 次抗体は, ウサギ抗マウス FasR ポリクローナル抗体

(A-20, 400 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), ウサギ抗ヒト FasL ポリクローナル抗体 (Q-20, マウス FasL との交差反応あり, 600 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology Inc.), ウサギ抗ヒトカスパーゼ-3 ポリクローナル抗体 (500 倍希釈, Dako), ラット抗マウスアネキシン V モノクローナル抗体 (10 倍希釈, 金沢大学医学部医学科病理学第二教室, 片柳和義先生より供与<sup>29)</sup>) を用いた。なお, ウサギ抗ヒトカスパーゼ-3 ポリクローナル抗体とマウスカスパーゼ-3 との交差反応性を, 後述の如くウエスタンブロッティング法で確認した。観察は光学顕微鏡下で行い, FasR, FasL およびアネキシン V に関しては, 陰性, 軽度陽性, 中等度陽性, 強陽性の 4 段階で評価し, カスパーゼ-3 に関しては陽性率 (カスパーゼ-3 陽性細胞数/全細胞数  $\times$  100) で評価した。

### 2. ウエスタンブロッティングによる検討

ウエスタンブロッティングにより, 上記ウサギ抗ヒトカスパーゼ-3 ポリクローナル抗体 (DAKO) とマウスカスパーゼ-3 との交差反応性を確認し, またカスパーゼ-3 の経時的発現の推移を検討した。BV で 12 時間および 48 時間処理した  $10^6$  個の MBEC-W 細胞を回収し, 蛋白溶解液 [20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1% SDS, 1% Triton-X 100 および 1% デオキシコール酸ナトリウムを含有] にてホモジナイズした。遠心 (4℃, 12,000g, 30 分) 後上清を回収し, 蛋白濃度  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整した。抽出蛋白を 2-メルカプトエタノールにて還元し SDS-PAGE にて蛋白を分離後, 電気的にニトロセルロース膜に転写した。転写膜を 5% ウシ血清アルブミンにてブロッキングした後, 抗ヒトカスパーゼ-3 抗体 (DAKO) および Envision+ (ウサギ, 10 倍希釈, DAKO) を順次反応させ, DAB にて褐色に可視化した。なお予想される蛋白の分子量は, マウスプロカスパーゼ-3 が 32kDa (p32), プロセッシングをうけたマウスカスパーゼ-3 が 29kDa (p29), 17kDa (p17) および 12kDa (p12) である<sup>44)</sup>。

## V. GCDCA 負荷胆管細胞における mRNA の発現量解析

薬剤非負荷および GCDCA 負荷培養細胞から RNA を抽出した後, 逆転写 (reverse-transcription, RT) -PCR 法により FasR, FasL, アネキシン V, ASBT, IL-18 および IL-18R $\alpha$  の mRNA を検出し半定量的に評価した。ASBT, IL-18 および IL-18R $\alpha$  に関してはそれぞれに対応する PCR 産物の塩基配列の解析も行った。

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in this study

	Sense	Antisense	PCR product (bp)	GenBank-accession number
FasR	5'-CATCTCCGAGAGTTTAAAGC-3'	5'-GTTTCCTGCAGTTTGTATTGCT-3'	201	M83649
FasL	5'-AGTGCCACTTCATCTTGGGC-3'	5'-TACCACCGGTAGCCACAGATT-3'	201	U06948
Annexin V	5'-AGCGCCAGGAAATTGCTCAGGA-3'	5'-AGGTCAATCTCACTCCTCGACAC-3'	697	U29396
ASBT	5'-CACAAACGTATCAGCCCCCTT-3'	5'-ACCGTACTGGGCCACTATGG-3'	201	D87059
IL-18	5'-AACAATGGCTGCCATGTCAG-3'	5'-TCCTCGAACACAGGCTGTCTT-3'	201	U66244
IL-18R $\alpha$	5'-TATAATTGCACCGTGGCCAA-3'	5'-TGGATCTCCTCGACAACAGCT-3'	401	U43673
$\beta$ -actin	5'-GCTATGCTCTCCCTCAGCCAT-3'	5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCCGC-3'	627	X03765
pGEM161	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'			
pGEM2911		5'-GTTTTCCTCCAGTACAGAC-3'		
pGEM2944	5'-GTTTTCCTCCAGTACAGAC-3'			

pGEM161 and pGEM2911 are vector primer used in the PCR amplification. pGEM2944 is a vector primer used in cycle sequencing.

### 1. 全RNAの抽出

RNAの抽出はグアニジウムチオシアネート-フェノール-クロロホルム法<sup>49)</sup>にて行った。すなわち、各ウェルをIAコラゲナーゼで処理しゲルを完全に溶解後、 $10^6$ 個の培養細胞を回収した。これに4℃、0.8mlのISOGEN (ニッポンジーン、富山)を入れホモジナイズ後、400 $\mu$ lのクロロホルムを加え5分間氷上に放置した。遠心(4℃、12,000g、15分)後、水相を採取し、等量のイソプロパノールにて核酸を沈殿させ全RNAを得た。これを0.1%のジエチルピロカーボネイトでRNaseを失活化した滅菌蒸留水に溶解し、各検体を吸光度計にて濃度測定後、1 $\mu$ g/ $\mu$ lに調整した。

### 2. 逆転写反応

RNA試料1 $\mu$ gに250ngのランダムプライマー (Boehringer Mannheim)を加え70℃で10分間加熱後、水中にて急冷した。これにdNTP 500nM, 逆転写酵素200単位 (SuperScript™ II, Gibco-BRL, Gaithersburg, USA), ジチオスレイトール10mMおよび8 $\mu$ lの添付RT緩衝液を加え、全量を20 $\mu$ lとした後、42℃で50分間cDNA合成を行った。最後に70℃、10分間で酵素を失活化させ、反応を停止させた。

### 3. PCR反応

cDNA溶液1 $\mu$ lに、dNTP 0.2mM, センスおよびアンチセンスプライマー (各1 $\mu$ M, 表1), 添付PCR緩衝溶液, Taq DNAポリメラーゼ (1.25単位, 宝酒造, 東京) および滅菌蒸留水を加え全量を50 $\mu$ lに調整した。これに50 $\mu$ lのミネラルオイルを重ね層させ、DNAサーマルサイクラー (MJ research, South San Francisco, USA)でPCR反応を行った。熱変性(94℃、1分間), アニーリング(54℃、1分間), DNA伸張(72℃、1分間)を1サイクルとして $\beta$ -アクチンおよびIL-18R $\alpha$ については25サイクル, ASBTおよびIL-18については28サイクル, FasR, FasLお

よびアネキシンVについては30サイクル施行した。次に5 $\mu$ lのPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムにて染色後、紫外線下で可視化した。

### 4. 増幅PCR産物の半定量化

FasR, FasL, アネキシンV, ASBT, IL-18およびIL-18R $\alpha$ に対応するPCR産物のバンド濃度をNIHイメージで数値化した。そしてハウスキーピング遺伝子である $\beta$ -アクチンの発現量を内部対照とし、 $\beta$ -アクチンに対する比率でmRNA量の半定量化を行った。なお、定量性を示す最適なPCRサイクル数は、PCR産物濃度のプロテイング曲線を作成し、サイクル数と濃度が直線性を示す範囲で決定した。

### 5. PCR産物のサブクローニングおよび塩基配列の解析

PCR産物の塩基配列を確認するため、pGEM-Tベクターシステム (Promega, Madison, USA)を用いてサブクローニングを行った後、塩基配列を決定した。すなわち、PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatworth, USA)にて精製後、PCR産物をpGEM-Tベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、次にこのベクターをJM109コンピテント細胞に導入した。挿入および導入の確認は5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドおよびイソプロピル-チオ- $\beta$ -ガラクトシドを用いた呈色選択にて行った。陽性コロニーを採取し、ベクター領域で作成したセンスおよびアンチセンスプライマー (pGEM 161およびpGEM 2911, 表1)でPCR反応を行った。マルチクローニングサイトに挿入されたPCR産物の塩基数 (ASBT, IL-18ともに201bp)を確認後、表1に示すベクタープライマー (pGEM 2944) およびDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems, USA)でシーケンス用PCRを行った。次にABI Prism 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems)で塩基配列の解析を行った。解析結果は

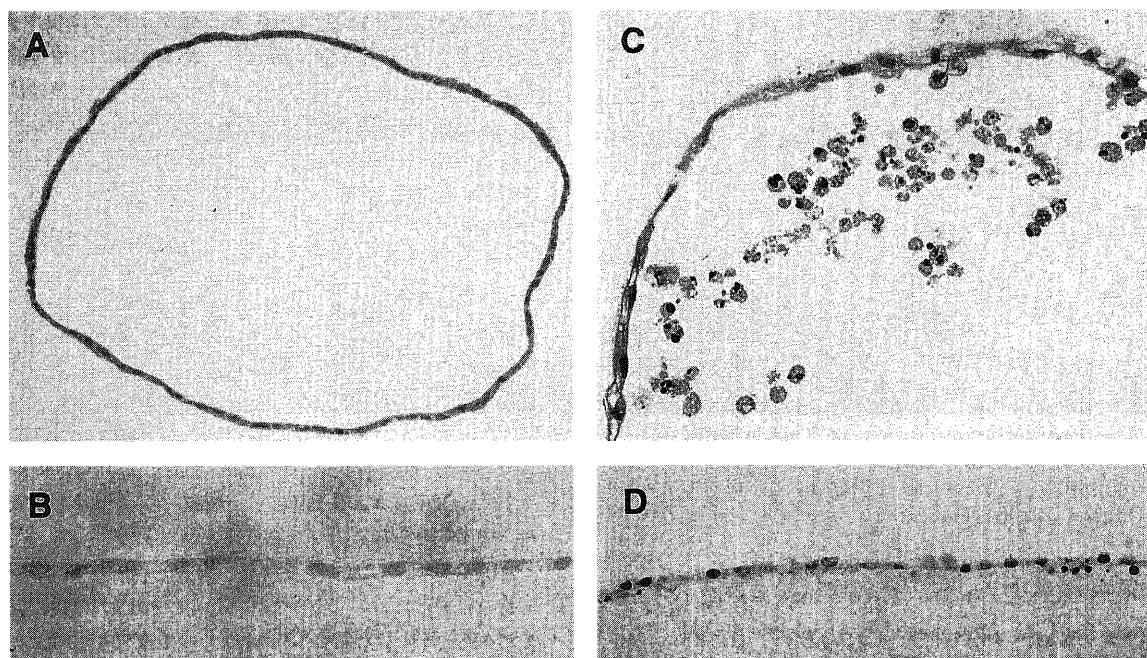


Fig. 1. Apoptosis induced by GCDCA in MBEC-W. (A) and (B) Untreated MBEC-W. (C) and (D) 500 $\mu$ M GCDCA-treated MBEC-W for 24 hrs. (A) and (C) Three-dimensional cell culture. (B) and (D) Monolayer cell culture. (A) and (C) hematoxylin and eosin staining. (B) and (D) TUNEL method counterstained with methyl-green. (Original magnification x500)

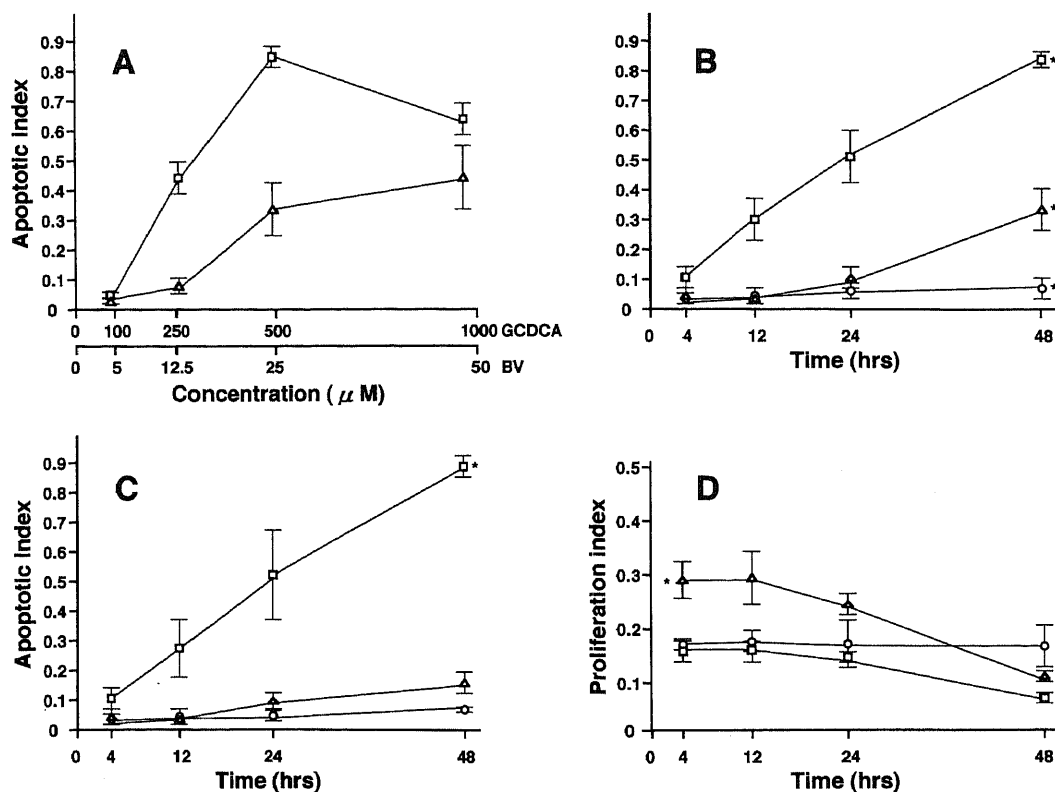


Fig. 2. Apoptotic index and proliferation index in MBEC-W or MBEC-lpr. (A) Apoptotic index (TUNEL-positive cells/total cell counts) in MBEC-W after the treatment with GCDCA or BV at various concentrations under the fixed incubation time (48hrs). (B) Apoptotic index in MBEC-W under the fixed concentration of GCDCA and BV (500  $\mu$ M and 25  $\mu$ M, respectively). (C) Apoptotic index in MBEC-lpr under the fixed concentration of GCDCA and BV (500  $\mu$ M and 25  $\mu$ M, respectively). (D) Proliferation index (PCNA-positive cells/total cell counts) in MBEC-W under the fixed concentration of GCDCA and BV (500  $\mu$ M and 25  $\mu$ M, respectively). \*Significant difference versus the other two groups ( $p < 0.05$ ); ○, untreated MBEC; △, GCDCA-treated MBEC; □, BV-treated MBEC. Data is given as  $\bar{X} \pm SD$ .

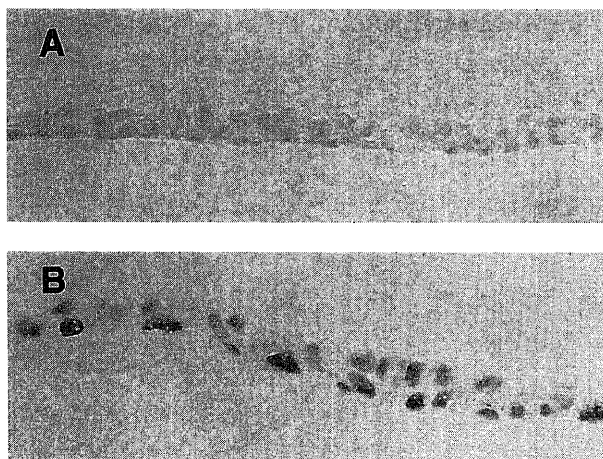


Fig. 3. Immunohistochemical staining of PCNA in MBEC-W of monolayer cell culture counterstained with methyl-green. (A) Untreated MBEC. (B) 500  $\mu$ M GCDCA-treated MBEC for 4 hrs. (Original magnification x500)

GenBank データベースから得たマウス ASBT, IL-18 および IL-18  $\alpha$  の塩基配列と照合した。

#### VI. 培養上清中の活性型 IL-18 濃度の測定

BALB/c 由来培養胆管上皮細胞株の培養上清中の活性型 IL-18

濃度を ELISA 法にて測定した。すなわち薬剤非負荷および GCDCA 負荷 MBEC-W 細胞 (約  $10^6$  個相当) の培養上清を採取し、抗マウス IL-18 抗体感作マイクロカップ [マウス IL-18 ELISA キット (医学生物学研究所, 愛知)] に 3  $\mu$ l ずつ添加, 室温で 1 時間放置した。洗浄後, ペルオキシダーゼ標識抗マウス IL-18 抗体を室温で 1 時間反応させ, テトラメチルベンチジンを基質として標識ペルオキシダーゼを発色させた。反応停止後 450nm の吸光度を測定し標準曲線から培養上清中の IL-18 濃度を測定した。

#### Ⅶ. 統計解析

結果は, 各実験系ごとに計 4 回測定し,  $\bar{X} \pm SD$  を計算した。Mann-Whitney U-test にて統計解析し,  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判断した。

#### 成 績

##### I. GCDCA および BV による培養マウス胆管上皮細胞のアポトーシスおよび細胞増殖の誘導

MBEC-W に GCDCA を負荷した場合, 単層培養および 3 次元培養のいずれにおいても, 250  $\mu$ M 以上の濃度で 24 時間後から, また BV を負荷した場合 10  $\mu$ M 以上の濃度で 4 時間後から形態学的にアポトーシスを示唆する変化 (クロマチンの濃縮およびアポトーシス小体の形成) が観察された (図 1C)。TUNEL 染色にてこれらの細胞の核に陽性所見を認め, TUNEL 陽性のアポ



トーシス細胞と考えられた (図1D). GCDCA 負荷後の MBEC-W のアポトーシス指数は GCDCA の濃度およびその負荷時間に依存して増加し,  $500\mu\text{M}$  GCDCA を負荷した MBEC-W における 48 時間後のアポトーシス指数は  $0.32 \pm 0.06$  であった (図2A, 図2B). 一方, 壊死性変化 (特に細胞膨化および細胞融解) は,  $1000\mu\text{M}$  以上の GCDCA 濃度および  $50\mu\text{M}$  以上の BV 濃度で高頻度に観察された. これらの成績より, 以後のアポトーシスに関する実験は, GCDCA の濃度を  $500\mu\text{M}$  に, BV の濃度を  $25\mu\text{M}$  に設定して行った. 48 時間後のアポトーシス指数は, GCDCA 負荷群で  $0.32 \pm 0.06$ , BV 負荷群で  $0.83 \pm 0.02$  であり (図2B), GCDCA によるアポトーシス誘導能は BV に比し有意に軽度であった.

一方, MBEC-lpr では, GCDCA 負荷群および BV 負荷群の 48 時間後のアポトーシス指数は各々,  $0.13 \pm 0.03$ ,  $0.90 \pm 0.03$  (図2C) で, BV 負荷群で有意に高値であった. また, MBEC-lpr と MBEC-W のアポトーシス指数の比較では, BV 負荷では両者に有意差はなかった ( $0.83 \pm 0.02$  および  $0.90 \pm 0.03$ ) が, GCDCA 負荷群では MBEC-lpr ( $0.13 \pm 0.03$ ) は MBEC-W ( $0.32 \pm 0.06$ ) に比し有意に低値であった.

PCNA の発現は核に認められた (図3). MBEC-W における 4 時間後の増殖指数 (PCNA 陽性率) は無添加群 ( $0.18 \pm 0.02$ ) および BV 負荷群 ( $0.16 \pm 0.02$ ) に比し, GCDCA 負荷群 ( $0.29 \pm 0.03$ ) で有意に増加し, GCDCA 負荷 12 時間後から緩徐に低下した (図2D). 一方, 無添加群における増殖指数はほぼ一定で

Table 2. Immunohistochemical expression of FasR, FasL, and annexin V in cultured murine biliary epithelial cells.

	MBEC-W		MBEC-lpr	
	Untreated	GCDCA-treated	Untreated	GCDCA-treated
FasR	+	+++	—	—
FasL	—~+	+++	—~+	+++
Annexin V	++*	+++**	++*	++*

—, no expression; +, mild expression; ++, moderate expression; +++, strong expression; \* Moderate cytoplasmic expression; \*\* Moderate cytoplasmic expression and strong membranous expression.

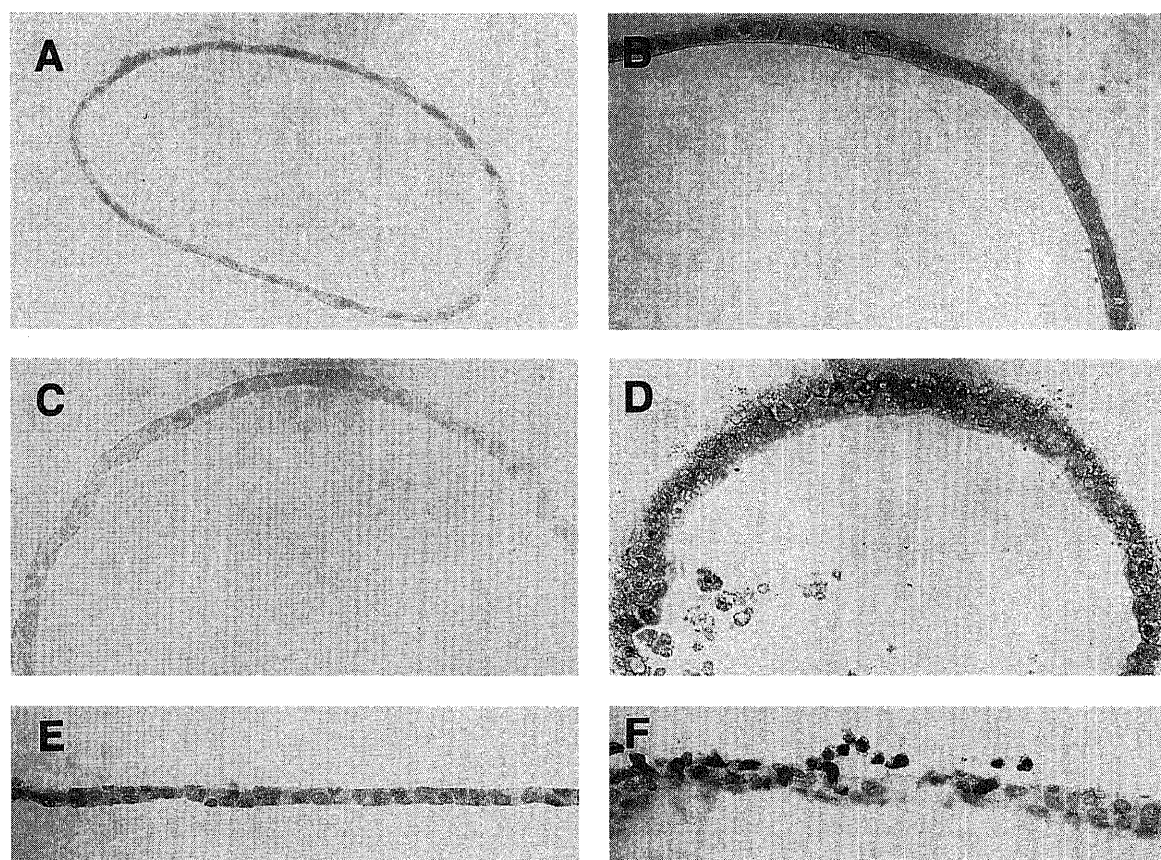


Fig. 4. Immunohistochemical staining of FasR, FasL and annexin V in MBEC-W counterstained with hematoxylin. (A) FasR expression in untreated MBEC-W. (B) FasR expression in  $500\mu\text{M}$  GCDCA-treated MBEC-W for 24 hrs. (C) FasL expression in untreated MBEC-W. (D) FasL expression in  $500\mu\text{M}$  GCDCA-treated MBEC-W for 24 hrs. (E) Annexin V expression in untreated MBEC-W. (F) Annexin V expression in  $500\mu\text{M}$  GCDCA-treated MBEC-W for 48 hrs. (A-D) Three-dimensional cell culture. (E) and (F) Monolayer cell culture. (Original magnification x500)

あり, またBV負荷群では培養時間とともに緩徐に低下した(図2D).

## II. アポトーシス関連分子の発現

### 1. FasRの発現

免疫組織化学的検討により, 無添加群ではMBEC-Wの細胞質にFasRの弱い発現が認められたのに対し, MBEC-lprではFasRの発現は認められなかった(図4A, 表2). GCDCA負荷群では, MBEC-Wの細胞質に強いFasRの発現が認められたのに対し, MBEC-lprではFasRの発現は認められなかった(図4B, 表2). またMBEC-WにおけるFasR mRNA量はGCDCA負荷4時間後から増加し, 以後漸増した(図5, 図6A).

### 2. FasLの発現

免疫組織化学的検討により, FasLはMBEC-WおよびMBEC-lprの無添加群において, 陰性あるいは細胞質で弱陽性に出現した(図4C, 表2). GCDCA負荷群では, 両細胞株ともにFasLの強い発現が認められた(図4D, 表2). またMBEC-WにおけるFasL mRNA発現量は, GCDCA負荷24時間後から急激に増加した(図5, 図6B).

### 3. アネキシンVの発現

免疫組織化学的検討により, 無添加群においてMBEC-WおよびMBEC-lprの細胞質にアネキシンVの中等度の発現が認め

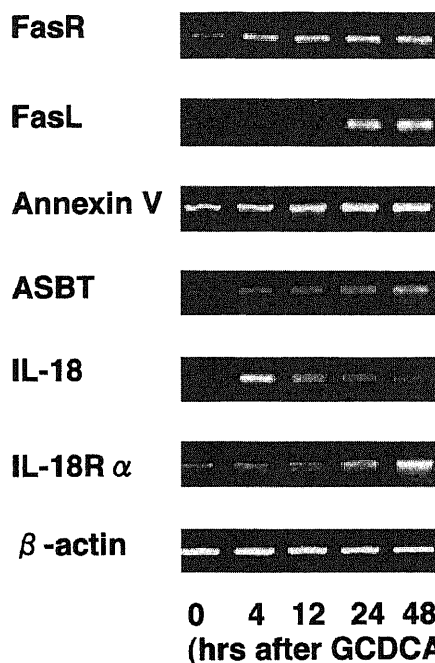


Fig. 5. The bands of RT-PCR of mRNAs of FasR, FasL, annexin V, ASBT, IL-18, IL-18R $\alpha$  and  $\beta$ -actin in MBEC-W after the treatment with 500  $\mu$ M GCDCA.

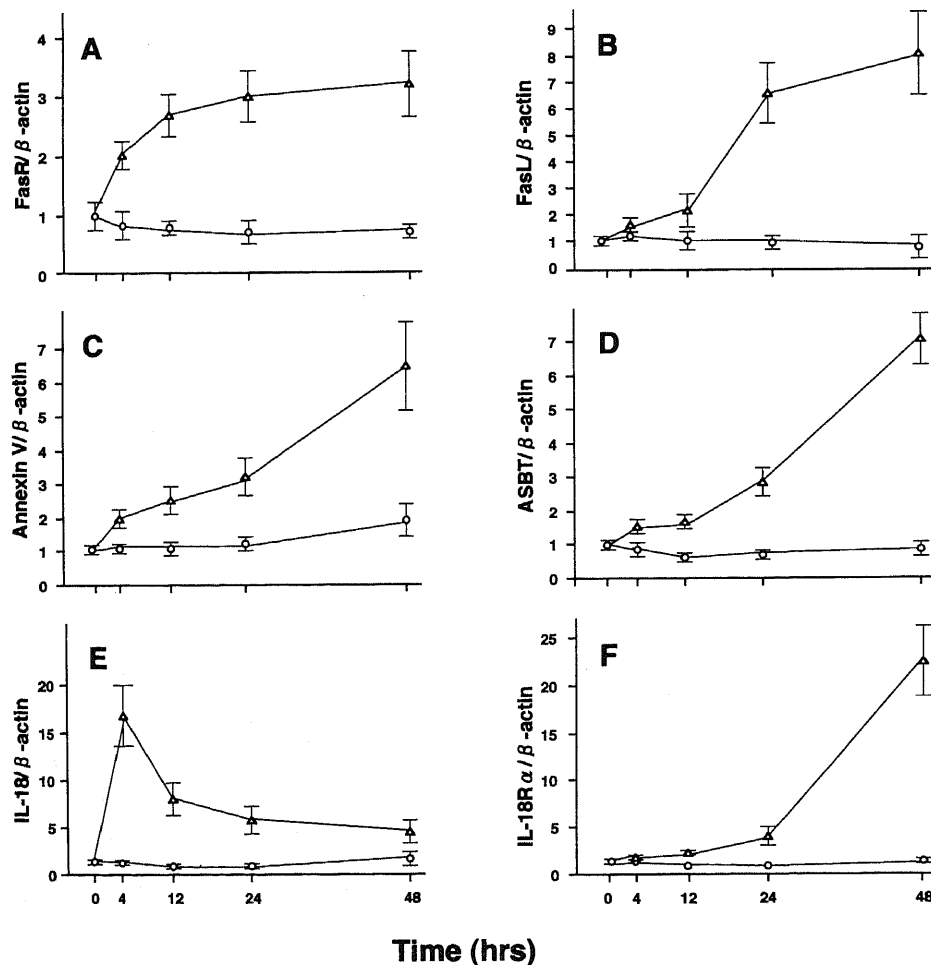


Fig. 6. The intensity ratio of RT-PCR products for FasR, FasL, annexin V, ASBT, IL-18 and IL-18R $\alpha$  mRNA against those for  $\beta$ -actin in MBEC-W after the treatment with 500  $\mu$ M GCDCA. Data is analyzed by NIH image and is given as  $\bar{X} \pm SD$ . (A) FasR. (B) FasL. (C) Annexin V. (D) ASBT. (E) IL-18. (F) IL-18R $\alpha$ . ○, untreated MBEC; △, GCDCA-treated MBEC.

られた (図4E, 表2). GCDCA負荷群では, MBEC-Wの細胞質の発現に加え細胞膜に強いアネキシンVの発現が認められた (図4F, 表2). 一方MBEC-lprではアネキシンVの発現は非負荷群と同程度であった (表2). またMBEC-WにおけるアネキシンVのmRNA量は, 時間の経過とともに緩徐に増加した (図5, 図6C).

#### 4. カスパーゼ-3の発現

1). ウェスタンブロッティングによる抗ヒトカスパーゼ-3抗体の認識抗原に関する検討

BV非負荷MBEC-Wではプロカスパーゼ-3 (p32), p29, p17およびp12のいずれのバンドも検出されなかった. 一方, BV負荷MBEC-Wでは, 12, 48時間後に29kDのバンドが検出された (図7). この結果より, 使用した抗体はプロドメインが切断された活性型マウスカスパーゼ-3 (p29) を認識しているものと考えられた. なお, その他の活性型カスパーゼ-3断片であるp17およびp12は検出されなかった.

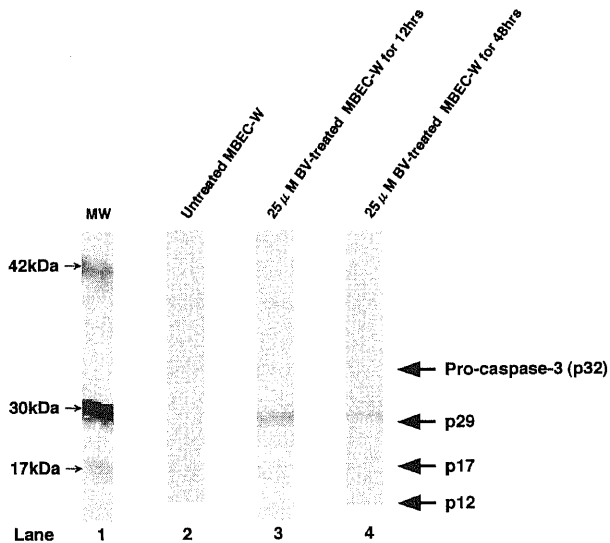


Fig. 7. Western blot analysis for caspase-3 in BV-treated MBEC-W. Lane 1, molecular weight marker; Lane 2, untreated MBEC-W; Lane 3, 25  $\mu$ M BV-treated MBEC-W for 12 hrs; Lane 4, 25  $\mu$ M BV-treated MBEC-W for 48 hrs.

#### 2). 培養細胞組織切片におけるカスパーゼ-3陽性率の検討

##### i. MBEC-W

免疫組織化学的検討により, カスパーゼ-3は細胞質に発現した (図8). 無添加群でのカスパーゼ-3陽性率は, 3%前後で培養時間と関係なくほぼ一定であった (図9A). 一方BV負荷群では12時間後にカスパーゼ-3の陽性率は $53 \pm 12\%$ と上昇し, 以後次第に低下した. この結果はウェスタンブロッティングでのバンド強度の時間的経過の推移とほぼ一致した. またGCDCA負荷群におけるカスパーゼ-3の陽性率は24時間後から上昇し, 48時間後では $35 \pm 5\%$ であった.

##### ii. MBEC-lpr

無添加群でのカスパーゼ-3陽性率は, 2%前後で培養時間に関係なくほぼ一定であり, MBEC-Wと同様の陽性率であった (図9B). また, BV負荷群では12時間後にカスパーゼ-3の陽性率は $46 \pm 12\%$ と上昇, 以後次第に低下し, MBEC-Wとほぼ同様の経過であった. しかし, GCDCA負荷群でのカスパーゼ-3陽性率は, 5%前後で培養時間に関係なくほぼ一定であった (図8B, 図9B).

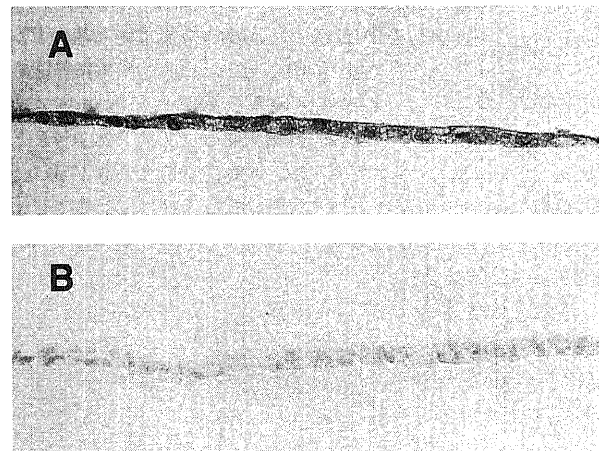


Fig. 8. Immunohistochemical staining for caspase-3. (A) 250  $\mu$ M GCDCA-treated MBEC-W for 24 hrs. (B) 500  $\mu$ M GCDCA-treated MBEC-lpr for 24 hrs. (Monolayer cell culture counterstained with hematoxylin; original magnification x500)

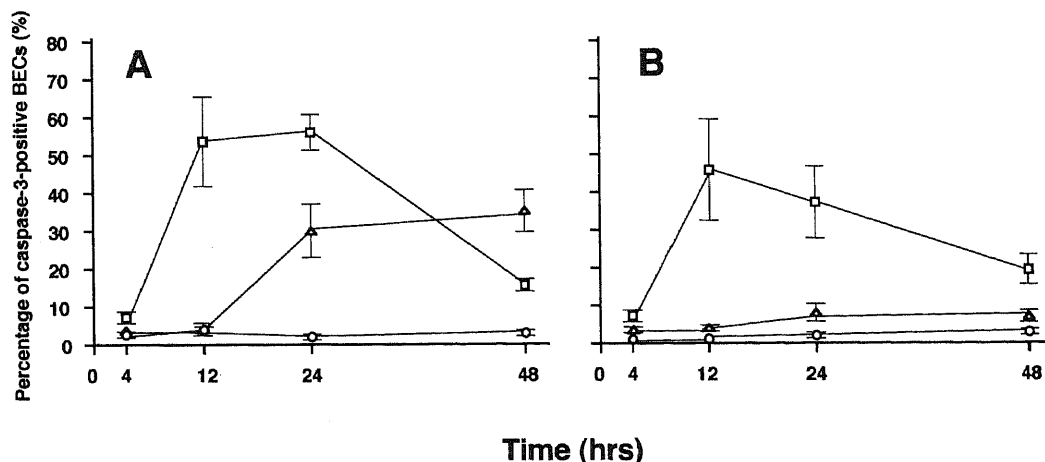


Fig. 9. The percentage of caspase-3-positive BECs after the treatment with 500  $\mu$ M GCDCA or 25  $\mu$ M BV. (A) MBEC-W. (B) MBEC-lpr. ○, untreated MBEC; △, GCDCA-treated MBEC; □, BV-treated MBEC. Data is given as  $\bar{X} \pm SD$ .



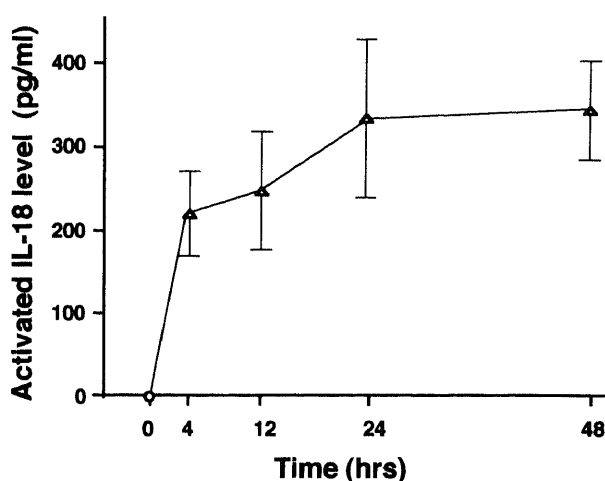


Fig. 10. Detection of activated IL-18 in cell supernatants of MBEC-W after the treatment with 500  $\mu$ M GCDCA. Data is given as  $\bar{X} \pm$  SD.

### Ⅲ. ASBT, IL-18 および IL-18R $\alpha$ mRNA の発現

MBEC-W では、GCDCA 非負荷および GCDCA 負荷に拘わらず、ASBT, IL-18 および IL-18R $\alpha$  mRNA の恒常的発現が RT-PCR 法によって確認された (図 5)。またこれらの PCR 産物の塩基配列は GenBank データベースの ASBT, IL-18 および IL-18R $\alpha$  の塩基配列と一致し、目的としている mRNA を検出していることが確認できた。さらに半定量解析により、MBEC-W における ASBT mRNA 量は GCDCA 負荷後培養時間とともに増加した (図 5, 図 6D)。IL-18 mRNA 量は、GCDCA 負荷 4 時間後に急速に増加し、その後次第に低下した (図 5, 図 6E)。この急激な IL-18 mRNA の発現亢進は GCDCA による FasL mRNA の発現亢進に先行して観察された (図 6B, 図 6E)。また IL-18R $\alpha$  mRNA 量は GCDCA 負荷後緩徐に増加したのち 48 時間後に急激に増加した (図 5, 図 6F)。

### Ⅳ. 培養上清中の活性型 IL-18 の検出

無添加 MBEC-W における培養上清中の活性型 IL-18 の濃度は培養時間に関係なく検出感度以下であった。しかし GCDCA 負荷 MBEC-W での活性型 IL-18 濃度は負荷後直ちに上昇し、経過とともに漸増した (図 10)。

### 考 察

ヒトの胆汁酸成分は主として、疎水性胆汁酸であるコール酸 (cholic acid, CA), デオキシコール酸 (deoxycholic acid, DCA) およびケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) と、親水性胆汁酸である UDCA のタウリンもしくはグリシン抱合体で構成されている<sup>40)</sup>。従来、胆汁酸の細胞毒性はその疎水性に依存した界面活性作用による細胞膜障害あるいは種々の機序によるミトコンドリア障害が考えられており<sup>23)24)47)~49)</sup>、これらはいずれもネクロシスによる細胞死を特徴としたメカニズムであった。一方、UDCA を代表とする親水性胆汁酸は、疎水性胆汁酸との競合や、ミトコンドリア膜の安定化により細胞保護作用を呈すると報告されている<sup>20)21)49)</sup>。しかしながら、近年、肝細胞に対する疎水性胆汁酸のアポトーシス誘導作用<sup>20)23)24)</sup>と UDCA の抗アポトーシス作用<sup>20)~22)</sup>が報告され、胆汁うっ滞に

伴う肝細胞障害はネクロシスよりもむしろアポトーシスが重要であると考えられるようになった。

胆汁酸は、肝細胞のみならず肝内胆管細胞に対しても、様々な作用を有していると考えられている。ヒト慢性胆汁うっ滞性肝疾患では、疎水性胆汁酸が血中および肝内に蓄積しており、これが肝細胞のみならず胆管上皮細胞に対しても細胞傷害性に作用すると報告されている<sup>23)24)</sup>。一方、実験動物での閉塞性黄疸や 70% 肝切除、また PBC、原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC)、肝外性胆道閉塞症などのヒト慢性胆道系疾患では、胆汁うっ滞に伴い肝内胆管の増殖性変化が認められること<sup>50)~53)</sup>、またラット実験モデルで胆汁酸 (特に親水性胆汁酸) が、胆管細胞の DNA 合成、セクレチン受容体の発現、セクレチン依存性の cAMP 合成などを亢進させる作用を有することが示されている<sup>50)51)54)</sup>。

近年、自己免疫性胆道系疾患にみられる胆管破壊の過程で、胆管細胞の細胞動態、すなわち細胞増生と細胞死のバランスの乱れが重要であると報告されている<sup>7)52)53)</sup>。胆管上皮の細胞死の主たる経路としてアポトーシスが重要と考えられ、実際 PBC の障害胆管では TUNEL 法や電子顕微鏡的観察によりアポトーシスが示されている<sup>7)~9)</sup>。今回の研究では、胆管上皮は直接胆汁に接しており、胆汁中の主要成分である胆汁酸が胆管上皮のアポトーシス発生に関連しているとの想定で以下の実験を行った。GCDCA はヒトの一次胆汁酸構成成分の中で占める割合が最も高いこと<sup>40)</sup>、かつ肝細胞に対し最も強くアポトーシスを誘導する作用を有している<sup>55)</sup>ことより、特にこの胆汁酸を中心に検討した。

まず、マウス培養胆管細胞株に GCDCA を 250  $\mu$ M 以上の濃度で負荷すると細胞増殖亢進とアポトーシスによる細胞死が同時に生じることが示された。しかし GCDCA を 100  $\mu$ M 以下の低濃度で負荷した場合、細胞増殖は誘導されたがアポトーシスは確認されなかった。このことから、GCDCA の濃度が細胞増殖とアポトーシス死のバランスを規定する重要な因子であると考えられた。GCDCA を用いた研究により、本研究は PBC などの自己免疫性胆道系疾患での胆管破壊の基礎的研究となると思われる。

さて、胆汁酸の腸肝循環や抱合型胆汁酸の細胞内への取り込みは、主にナトリウム依存性の胆汁酸輸送機構により行われている<sup>56)</sup>。近年ラットおよびヒトの胆管細胞が小腸粘膜上皮と同様に ASBT を発現しているとの報告があり<sup>29)~32)</sup>、マウス胆管上皮細胞も ASBT を発現していることが本研究の RT-PCR 法によって示された。従って GCDCA は ASBT によって細胞内へ輸送されていると考えられ、この胆汁酸の細胞内移動が胆管細胞の増殖および細胞死のシグナル開始に直接関与している可能性がある。実際ラット培養肝細胞で、より疎水性の強い非抱合型の CDCA よりも GCDCA のほうが細胞障害を強く起こしたとの報告もあり<sup>21)</sup>、ASBT 等の胆汁酸輸送蛋白の存在が抱合型胆汁酸によるアポトーシス誘導に関連している可能性が示唆される。

PBC などの自己免疫性胆道系疾患での障害胆管に FasR の発現があり、またその周囲に FasL 陽性のリンパ球が浸潤していることから、これら細胞上の FasR と FasL の結合が胆管細胞のアポトーシスの発生に重要であると考えられている<sup>7)57)</sup>。しかし、FasL はリンパ球を含む血球系細胞以外にも発現しているとの報告がある。例えば甲状腺濾胞上皮には恒常的に FasL の発現があり、橋本病では FasR の過剰発現が加わって広範な濾胞上皮の破壊が生じる<sup>12)</sup>。また悪性腫瘍も FasL を発現し、

FasR陽性免疫担当細胞をアポトーシス死に陥らせる免疫回避機構が存在する<sup>13)~17)</sup>。これらの所見より、胆管上皮もFasLを発現し病態形成に関与している可能性があり、GCDCAを用いた系により検討した。その結果、MBEC-WにGCDCAを負荷すると、FasRおよびFasLの発現が高度に誘導されることが示され、またアポトーシスも誘導された。しかし、機能的FasR欠損マウス由来のMBEC-lprではGCDCA負荷によりFasLの発現亢進を認めたが、FasRの発現はなくアポトーシスは誘導されなかった。以上の所見より、マウス胆管上皮細胞はFasRおよびFasLを発現し、またGCDCAによる胆管上皮細胞のアポトーシス誘導はFasR/FasL系を介していることが示された。

次に、GCDCA依存性アポトーシスにおけるカスパーゼ-3の関与を検討した。IL-1 $\beta$ 変換酵素 (IL-1 $\beta$  converting enzyme, ICE)/CED-3ファミリーの一つであるカスパーゼ-3は、FasR/FasL系を介した細胞内シグナル伝達系の重要なアポトーシス実行蛋白とされている<sup>58)59)</sup>。ラット培養胆管細胞にBVを負荷した場合、カルシウム依存性にカスパーゼ-3を活性化しアポトーシスが誘導されるとの報告がある<sup>40)</sup>。今回、マウス胆管上皮細胞を用いBV負荷によるカスパーゼ-3の活性化について検討した。まずウエスタンブロッティング法により、無添加MBEC-Wでは非活性型 (プロカスパーゼ-3) および加工型 (p29, p17およびp12) のいずれも検出されなかったのに対し、BV負荷群ではp29が検出された。また免疫染色による検討でもBVおよびGCDCA負荷群でカスパーゼ-3 (p29) の発現亢進を認めた。この結果から今回用いた抗ヒトカスパーゼ3抗体 (DAKO) は、少なくともマウスカスパーゼ-3のp29成分と交差反応することが示され、またBV負荷によってプロカスパーゼ-3が加工され、活性型に変換される現象を示しているものと考えられた。Rodriguezら<sup>60)</sup>はFas依存性劇症肝炎の動物実験モデルでカスパーゼ-3の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した結果、肝全体より抽出した蛋白材料においてもp17のバンドは非常に弱かったとしている。従って細胞質内で産生された活性型カスパーゼ-3のp17, p12成分は急速に分解される可能性が考えられた。以上の結果より、BVおよびGCDCAによって誘導されるアポトーシス機構では、活性型カスパーゼ-3の検出されたことからFasRからの細胞内シグナルがカスパーゼ-3を介して実行されると考えられた。

次に、マウス胆管細胞におけるアポトーシスとアネキシンV発現との関連性を検討した。アネキシンVはカルシウム依存性フォスファチジルセリン結合蛋白として知られ、近年アポトーシスの検索に利用されているが、その機能に関してはいまだ不明の点が多い。最近、マウスの末梢小型胆管にアネキシンVが豊富に存在することが報告され、胆管の生理機能に関連していると推測されている<sup>28)</sup>。また、アネキシンVは細胞内カルシウム濃度が上昇した状態 (例えばBVの投与) で細胞質内から細胞膜上へと移動すると考えられている<sup>61)</sup>。今回、BVあるいはGCDCA負荷後の培養胆管細胞にアネキシンVの高度の細胞膜発現が観察され、初期のアポトーシスを反映しているものと考えられた。なお、Gidon-Jeangirardら<sup>62)</sup>はヒトTリンパ球モデルを用いた実験で、アネキシンVがカスパーゼ-3の活性化を抑制したと報告しており、マウス末梢小型胆管細胞におけるアネキシンVの恒常的な細胞内発現がBVあるいはGCDCAによるカスパーゼ-3の活性化を抑制している可能性も考えられた。

次に、胆管細胞によるIL-18産生とアポトーシスの関連を

検討した。IL-18はクッパー細胞に代表されるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) 刺激マクロファージや、ケラチノサイト、および脳のグリア細胞などで産生され、リンパ球に作用しインターフェロンの産生を亢進させることが知られている<sup>35)~38)63)</sup>。またTh1リンパ球やナチュラルキラー細胞に作用しFasLの発現やその機能の増強させる効果を有する<sup>35)38)</sup>。今回の培養胆管細胞を用いた研究では、GCDCA負荷によりFasRのmRNA量は刺激後4時間以内で増加したが、FasLは24時間後に発現が亢進した。これはFasR発現がGCDCAの直接作用により誘導され、FasLの発現には何らかの因子の介在があることを示唆している。次にFasL発現の調節因子であるIL-18に注目し検討を行った。その結果、RT-PCR法にて培養胆管細胞にIL-18およびIL-18R $\alpha$ のmRNA発現が確認され、胆管細胞が自らIL-18を産生し、IL-18のレセプターであるIL-18R $\alpha$ も発現していることが示された。またGCDCA負荷群においてIL-18 mRNAの発現亢進がFasL mRNAの発現亢進に先行していたこと、また培養上清中に活性型IL-18の分泌が認められたことから、IL-18がオートクリン、パラクリンの機序でFasLの発現を亢進させていることが考えられる。さらに、IL-18は非活性型として細胞内に産生され、またカスパーゼ-1によって活性型に変換されたのち分泌される<sup>64)65)</sup>ことから、マウス胆管上皮細胞はカスパーゼ-1を有していると推測される。またクローン病では腸管粘膜上皮細胞および粘膜固有層浸潤単核球からの活性型IL-18の分泌が認められ、局所免疫炎症反応の重要なサイトカインとして作用しているとの報告<sup>66)67)</sup>がある。従って胆道系においても胆管上皮細胞からのIL-18の産生がリンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞に作用し、自己免疫機序による胆管炎を惹起し、さらには胆管上皮にFasLの発現を誘導し、胆管上皮のアポトーシス発生に関係している可能性が示唆される。

## 結 論

疎水性胆汁酸であるGCDCAの肝内胆管細胞に対するアポトーシス誘導をマウス由来培養胆管上皮細胞を用いて免疫組織化学的および分子生物学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 野生型マウス (BALB/c) および機能的FasR欠損マウス (C3H・MRL-Fas<sup>lpr</sup>) からそれぞれ胆管細胞株 (MBEC-WおよびMBEC-lpr) を樹立した。

2. GCDCAはMBEC-Wに対してアポトーシス誘導効果および細胞増殖効果を有した。しかしながら機能的FasRを欠損したMBEC-lprでアポトーシスは誘導されなかった。

3. GCDCA負荷MBEC-WでFasR, FasL, アネキシンVおよび加工型カスパーゼ-3の発現亢進が認められた。アポトーシスがFasR/FasL系によるカスパーゼ-3の活性化を介して行われ、その過程でアネキシンVの細胞質から細胞膜への移動が生じていることが示された。

4. MBEC-Wでは、ASBT, IL-18およびIL-18R $\alpha$ のmRNAが恒常的に発現していた。また、GCDCAの負荷によってまずIL-18 mRNAが増加し、続いてFasL mRNAの増加が観察され、培養上清中に活性型IL-18の存在も証明された。

5. GCDCAはASBTを介しマウス胆管上皮細胞内に取り込まれ、FasR発現の亢進およびIL-18産生に伴うFasL発現亢進をきたし、胆管上皮細胞相互でのオートクリン、パラクリンの機序でFasR/FasL系を介しアポトーシスを誘導していることが示された。

生体内にあっても、このGCDCAを介した胆管上皮のアポトーシスが、PBCなどのヒトの肝内胆管病変の発生、進展に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師金沢大学医学部医学科内科学第一講座小林健一教授、ならびに直接御指導頂きました金沢大学医学部医学科病理学第二講座中沼安二教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に際し終始、御指導、御助言を頂きました病理学第二講座原田憲一講師、常山幸一助手、片柳和義助手ならびに教室の諸先生方、技師の方々に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Snover DC, Weisdorf SA, Ramsay NK, McGlave P, Kersey JH: Hepatic graft versus host disease: a study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis. *Hepatology* 1984, 4: 123-130.
- 2) Demetris AJ: Immune cholangitis: liver allograft rejection and graft-versus-host disease. *Mayo Clin Proc* 1998, 73: 367-379.
- 3) Vierling JM, Fennell RH Jr: Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts. *Hepatology* 1985, 5: 1076-1082.
- 4) Oguma S, Belle S, Starzl TE, Demetris AJ: A histometric analysis of chronically rejected human liver allografts: insights into the mechanisms of bile duct loss: direct immunologic and ischemic factors. *Hepatology* 1989, 9: 204-209.
- 5) Nawaz S, Fennell RH: Apoptosis of bile duct epithelial cells in hepatic allograft rejection. *Histopathology* 1994, 25: 137-142.
- 6) Gapany C, Zhao M, Zimmermann A: The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *J Hepatol* 1997, 26: 535-42.
- 7) Harada K, Ozaki S, Gershwin ME, Nakanuma Y: Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997, 26: 1399-1405.
- 8) Kuroki T, Seki S, Kawakita N, Nakatani K, Hisa T, Kitada T, Sawaguchi H: Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch* 1996, 429: 119-129.
- 9) Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Sata M, Tanikawa K: Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1997, 25: 1077-1084.
- 10) Houghton J, Korah RM, Kim KH: Fas receptor up-regulation and membrane localization concurrent with apoptosis in idiopathic esophageal ulceration: toward a better understanding of esophageal injury in AIDS. *J Infect Dis* 1999, 180: 211-215.
- 11) Gochoico BR, Miranda KM, Hessel EM, De Bie JJ, Van Oosterhout AJ, Cruikshank WW, Fine A: Airway epithelial Fas ligand expression: potential role in modulating bronchial inflammation. *Am J Physiol* 1998, 274: L444-449.
- 12) Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A: Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997, 275: 960-963.
- 13) Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997, 158: 4521-4524.
- 14) Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Brady C, Roche D, Collins JK, Shanahan F: The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 1998, 160: 5669-5675.
- 15) Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA: Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997, 57: 1007-1012.
- 16) Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR: Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996, 2: 1361-1366.
- 17) Yoong KF, Afford SC, Randhawa S, Hubscher SG, Adams DH: Fas/Fas ligand interaction in human colorectal hepatic metastases: A mechanism of hepatocyte destruction to facilitate local tumor invasion. *Am J Pathol* 1999, 154: 693-703.
- 18) Deschner EE, Cohen BI, Raicht RF: Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Digestion* 1981, 21: 290-296.
- 19) Iwasaki I, Iwase H, Yumoto N, Ide G: Promoting effects of bile acid to intestinal tumorigenesis in gnotobiotic ICR mice. *Acta Pathol Jpn* 1985, 35: 1427-1433.
- 20) Benz C, Angermuller S, Tox U, Kloters-Plachky P, Riedel HD, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A: Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J Hepatol* 1998, 28: 99-106.
- 21) Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ: A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998, 101: 2790-2799.
- 22) Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ: Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998, 4: 165-178.
- 23) Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ: Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J Clin Invest* 1993, 92: 17-24.
- 24) Patel T, Bronk SF, Gores GJ: Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994, 94: 2183-2192.
- 25) Alpini G, Glaser S, Robertson W, Phinizz J, Rodgers RE, Caligiuri A, LeSage G: Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997, 273: G518-529.
- 26) Alpini G, Glaser SS, Ueno Y, Rodgers R, Phinizz J, Francis H, Baiocchi L, Holcomb LA, Caligiuri A, LeSage GD: Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology* 1999, 116: 179-186.

- 27) Benedetti A, Alvaro D, Bassotti C, Gigliozzi A, Ferretti G, La Rosa T, Di Sario A, Baiocchi L, Jezequel AM: Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: a study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1997, 26: 9-21.
- 28) Katayanagi K, Van de Water J, Kenny T, Nakanuma Y, Ansari AA, Coppel R, Gershwin ME: Generation of monoclonal antibodies to murine bile duct epithelial cells: identification of annexin V as a new marker of small intrahepatic bile ducts. *Hepatology* 1999, 29: 1019-1025.
- 29) Que FG, Phan VA, Phan VH, LaRusso NF, Gores GJ: GUDC inhibits cytochrome c release from human cholangiocyte mitochondria. *J Surg Res* 1999, 83: 100-105.
- 30) Benedetti A, Di Sario A, Marucci L, Svegliati-Baroni G, Schteingart CD, Ton-Nu HT, Hofmann AF: Carrier-mediated transport of conjugated bile acids across the basolateral membrane of biliary epithelial cells. *Am J Physiol* 1997, 272: G1416-1424.
- 31) Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF: Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 1997, 100: 2714-2721.
- 32) Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinizz J, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD: Functional expression of the apical Na<sup>+</sup>-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* 1997, 113: 1734-1740.
- 33) Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 103: 11-24.
- 34) Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol* 1999, 162: 5041-5044.
- 35) Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K, Higashino K, Okamura H, Miyazawa Y, Kaneda K: IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol* 1996, 157: 3967-3973.
- 36) Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H: Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 1996, 173: 230-235.
- 37) Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, Higashino K, Nakanishi K: IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997, 159: 3961-3967.
- 38) Ohtsuki T, Micallef MJ, Kohno K, Tanimoto T, Ikeda M, Kurimoto M: Interleukin 18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells. *Anticancer Res* 1997, 17: 3253-3258.
- 39) Katayanagi K, Kono N, Nakanuma Y. Isolation, culture and characterization of biliary epithelial cells from different anatomical levels of the intrahepatic and extrahepatic biliary tree from a mouse. *Liver* 1998; 18: 90-98.
- 40) Kawamura Y, Yoshida K, Nakanuma Y. Primary culture of rabbit gallbladder epithelial cells in collagen gel matrix. *Lab Invest* 1989; 61: 350-356.
- 41) Que FG, Gores GJ, LaRusso NF: Development and initial application of an in vitro model of apoptosis in rodent cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997, 272: G106-115.
- 42) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-376.
- 43) Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1349-1353.
- 44) Jones RA, Johnson VL, Buck NR, Dobrota M, Hinton RH, Chow SC, Kass GE. Fas-mediated apoptosis in mouse hepatocytes involves the processing and activation of caspases. *Hepatology* 1998; 27: 1632-1642.
- 45) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- 46) Heuman DM. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J Lipid Res* 1989; 30: 719-730.
- 47) Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1991; 14: 920-926.
- 48) Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, Reichen J. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 1994; 19: 471-479.
- 49) Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 930-938.
- 50) Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N: Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* 1988, 81: 569-578.
- 51) Lesage G, Glaser SS, Gubba S, Robertson WE, Phinizz J, Lasater J, Rodgers RE, Alpini G: Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology* 1996, 111: 1633-1644.
- 52) Nakanuma Y, Ohta G: Immunohistochemical study on bile ductular proliferation in various hepatobiliary diseases. *Liver* 1986, 6: 205-211.
- 53) Nakanuma Y, Harada K: Florid duct lesion in primary biliary cirrhosis shows highly proliferative activities. *J Hepatol* 1993, 19: 216-221.
- 54) Alpini G, Ulrich CD 2nd, Phillips JO, Pham LD, Miller LJ, LaRusso NF: Upregulation of secretin receptor gene expression in rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am J Physiol* 1994, 266: G922-928.
- 55) Patel T, Spivey J, Vadakalam J, Gores GJ. Apoptosis - an

- alternative mechanism of bile salt toxicity. In: Paumgartner G, Beuers U, editors: *Bile Acids in Liver Diseases*. London: MTP Press; 1995. P.96-100.
- 56) Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH, Dawson PA: Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 1998, 274: G157-169.
- 57) Harada K, Van de Water J, Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Nakanuma Y, Gershwin ME: In situ nucleic acid hybridization of cytokines in primary biliary cirrhosis: predominance of the Th1 subset. *Hepatology* 1997, 25: 791-796.
- 58) Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* 1996; 315: 21-24.
- 59) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
- 60) Rodriguez I, Matsuura K, Ody C, Nagata S, Vassalli P. Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J Exp Med* 1996; 184: 2067-2072.
- 61) Blanchard S, Barwise JL, Gerke V, Goodall A, Vaughan PF, Walker JH. Annexins in the human neuroblastoma SH-SY5Y: demonstration of relocation of annexins II and V to membranes in response to elevation of intracellular calcium by membrane depolarisation and by the calcium ionophore A23187. *J Neurochem* 1996;67:805-813.
- 62) Gidon-Jeangirard C, Hugel B, Holl V, Toti F, Laplanche JL, Meyer D, Freyssinet JM. Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4+ and PrPc+ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* 1999; 162: 5712-5718.
- 63) Conti B, Park LC, Calingasan NY, Kim Y, Kim H, Bae Y, E Gibson G, Joh TH: Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res* 1999, 67: 46-52.
- 64) Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS: Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 1997, 275: 206-209.
- 65) Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H: caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997, 386: 619-623.
- 66) Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-147.
- 67) Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162: 6829-6835.

**Apoptosis of Cultured Murine Biliary Epithelial Cells Induced by Glycochenodeoxycholic Acid Involving the Fas Receptor and Its Ligand** Mitsuhiro Iwata, Department of Internal Medicine (I) and Department of Pathology (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., **109**, 34 — 47 (2000)

**Key words** Fas receptor/Fas ligand system, caspase-3, annexin V, apical sodium-dependent bile acid transporter, interleukin-18

#### Abstract

Fas-mediated apoptosis of biliary epithelial cells (BECs) is suggested as a main effector process in immune-mediated biliary diseases, particularly in primary biliary cirrhosis. BECs lining the biliary tree are constantly exposed to bile acids, and hydrophobic and hydrophilic bile acids have reportedly pro-apoptotic and anti-apoptotic effects. Glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), a conjugated hydrophobic bile acid, is known to cause apoptosis of hepatocytes via direct activation of the Fas receptor (FasR). In this study, we investigated the apoptotic process and effect of GCDCA on cultured murine intrahepatic BECs. It was found in this study that GCDCA induced apoptosis of BECs derived from BALB/c mice in a dose- and incubation time-dependent manner. Morphology and TUNEL positivity of the apoptotic processes of BECs induced by GCDCA were similar to those of BECs induced by beauvericin, which is known to induce apoptosis by direct activation of caspase-3, a member of the caspase family, at its downstream. GCDCA-induced apoptosis of BECs was accompanied by up-regulation of FasR, Fas ligand (FasL), annexin V, apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) and also caspase-3. GCDCA did not induce apoptosis of the BECs derived from C3H·MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice possessing non-functioning FasR, supporting the theory that the GCDCA-induced apoptosis of BECs in BALB/c involves the Fas system. Furthermore, GCDCA induced increased interleukin-18 mRNA expression in BECs and secretion of activated interleukin-18 from BECs from BALB/c, which might lead to the up-regulation of FasL mRNA and protein in BECs, followed by the FasR/FasL interaction. These results suggest that intracellular transport of GCDCA through ASBT induces apoptosis of BECs by the FasR/FasL interaction via an autocrine/paracrine effect and interleukin-18 may be responsible for the induction of FasL in BECs and that up-regulation of caspase-3 is also involved in this model. This model could be useful for the pathogenetical evaluation of immune-mediated biliary diseases characterized by Fas-mediated apoptosis of BECs.